第14卷 第3期　　昆虫学报　　Vol. 14, No. 3
1965 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1965

粘虫核型多角体病及其多角体的某些性質

ON THE NUCLEAR POLYHEDROSIS OF THE ARMYWORM AND CERTAIN CHARACTERISTICS OF ITS POLYHEDRA

謝天恩　　张光裕　　岑英华　　张英蓮
XIÈ TIĀN-ĒN,　ZHĀNG GUĀNG-YÙ　CÉN YING-HUĀ　ZHĀNG YING-LIAN
(中国科学院武汉微生物研究所)
(*Wuhan Institute of Microbiology, Academia Sinica*)

粘虫是禾谷类重要害虫之一。在自然条件下，粘虫能被病毒所感染，导致流行病(Raun, 1961; Tanada, 1961, 1962)。目前，已証实在行軍虫(*Pseudaletia unipuncta* Haworth)中有核型多角体病(Chapman et al., 1915; Steinhaus, 1951)、質型多角体病(Tanada et al., 1960)、顆粒体病及非包涵体病毒病(Wasser, 1952)的存在。Tanada 的工作表明：不同龄期行軍虫幼虫对核型多角体病毒的抵抗性是随着龄期的增长而加強(Tanada, 1956)。但以顆粒体病毒和核型多角体病毒混合感染老龄幼虫則敏感性大为提高(Tanada, 1959)。他还比較詳細地記述了行軍虫核型多角体病的症候学和病理学。本試驗报导粘虫(*Pseudaletia separata* Walker)的核型多角体病及其多角体的某些性質，为进一步研究粘虫病毒和利用多角体防除粘虫为害提供基本資料。

材 料 与 方 法

核型多角体病病毒，由中国科学院动物研究所昆虫資源研究室贈予，經我們实驗室进行人工感染，收集发病致死的幼虫，鉴定后将尸体置乳砵中，加入少量蒸餾水研磨，释放出多角体，二层紗布滤过，滤液以 3,000 rpm 30 分鈡反复离心洗滌多角体并除去杂質，收集多角体，儲存冰箱备用。

供試粘虫幼虫，由动物所昆虫資源室贈送卵块，在我們飼养室中挑选发育較一致的和外表健康的幼虫。

整个試驗过程喂以小麦叶片。温度 20—28℃，湿度 55—90%。

以添食方式进行感染。多角体悬液浓度，用血球計数器測定。小麦叶先以紗布擦干淨，用小团棉球沾附多角体悬液，均匀涂布叶片正、背面，湿潤为度，置室温晾半干，喂叶足供幼虫飽食 24 小时，然后单个分装飼养瓶中，换以新鮮叶片，每天清粪换叶一次，并检出病虫。核型多角体病的鉴定：以外表典型萎縮症状和鏡检虫体有大量多角体存在为依据。对照組以蒸餾水涂布叶片，其他步驟和条件与試驗組完全一致。

为了观察方便，避免幼虫逃失，提高实驗数字的准确性，試驗組和对照組均作单个体飼养，幼虫单个分养于抗菌素瓶或平皿中。所用玻璃器皿及用具均經高压蒸汽灭菌。

实 驗 結 果

(一) 核型多角体病的特征 罹病幼虫首先表現为食欲減退,行动迟鈍,发育緩慢,进而体色轉变为暗灰白色,在临死时行为显得急躁,頻繁地企图往瓶外逃跑,因此一般多死在飼养瓶上端,或感病幼虫常以腹足悬掛而死。死虫体壁十分脆弱,稍为触动就会破裂,并流出暗灰色的液体,鏡检时可見其中含有大量多角体。

根据瀕死幼虫的解剖观察,确定感染位置为脂肪組織,气管基层細胞及某些血球血胞。皮肤也受侵袭,多角体发育在細胞核中(图 1)。

(二) 核型多角体的形态大小及染色观察 局部提純的多角体,在光学显微鏡下观察,其大小(直径)由 1.2—3.6 微米,平均大小为 2.1 微米(根据 100 个多角体的测定結果)。不論染色与否,多角体的形态呈多角形,大多数为五角形和六角形(图 2)。

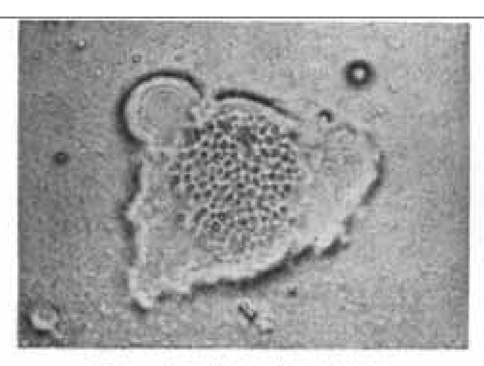


图 1　多角体在細胞核中的发育

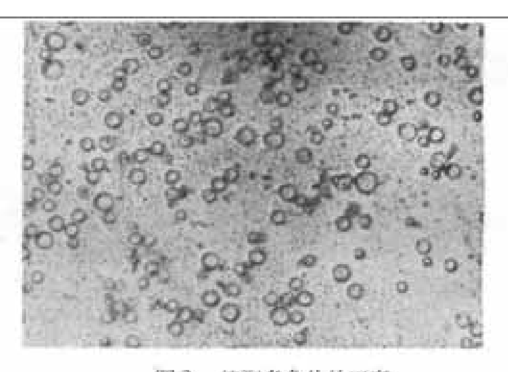


图 2　核型多角体的形态

多角体能被伊紅所上染(什維佐娃法),呈粉紅色。姬姆薩、孔雀綠、Seller 氏染液、Mann 氏染液,不易将多角体染上顏色,或仅輕微着色。如果涂片标本經什維佐娃法所提出的固定步驟(即用乙醇、甲醛等量混合液固定 20 分鈡,濾紙吸干,以 1% NaOH 作用一分鈡,水洗),然后分别入染上述各染液,則姬姆薩着色深紫,孔雀綠着綠色,Seller 和 Mann 二种染液着艳紅色,苏丹 III 不上染多角体。

(三) 不同化学药物对多角体溶解性試驗 将局部提純的多角体悬液与化学葯物作等量混合,或多角体 1 份葯物 9 份相混合,作用一小时,結果发現:蒸餾水、甲醛(36—40%)、純酒精、二甲苯、乙醚、1 *N* HCl,0.25% 胰蛋白酶和煮沸多角体,均不能溶解多角体,而 0.1$M Na_2CO_3$ 能使多角体溶解。

(四) 核型多角体的感染試驗 选取 1—6 龄的健康幼虫,20 头为一組,以 2×10^4 个/立方毫米浓度的多角体悬液涂布小麦叶片,喂飼幼虫,24 小时飽食沾染有多角体的叶片后,单个虫体分养飼养瓶中,兼加鮮叶,每天除粪換叶,并撿出死虫。这一处理称为单次感染試驗。而連續感染試驗組則在单个分养之后,即感染开始后的第 2、3、4、5 天內仍旧継續以涂有上述浓度多角体的小麦叶片喂飼幼虫。直到第 6 天才全部換以无多角体处理的鮮叶。

所有死虫,具外表典型的症状和經鏡检有大量多角体存在,就确定为核型多角体病致死,如果不符合这要求,作为他因致死記录。对照組以蒸餾水涂叶片、飼养管理同試驗組。

实验結果如图 3 所示。在单次感染試驗中，第 1 龄幼虫对多角体最为敏感，平均死亡率达 86.0%；第 2 龄幼虫为 39.0%；3 龄幼虫为 20.0%；4 龄幼虫为 16.0%；5 龄幼虫为 11.7%；6 龄幼虫为 5.1%。而在連續感染試驗中幼虫死亡率有显著的提高。第 2 龄幼虫多角体致死达 86.7%，第 3 龄幼虫为 43.0%；第 4 龄幼虫为 28.9%；第 5 龄幼虫为 11.1%；第 6 龄幼虫为 9.0%。

試驗表明：不同龄期幼虫对核型多角体的感受性有很明显的差别，卽趋向于龄期越大抗病性越強。若使粘虫持續地与病原接触則能显著地提高粘虫的感受性。

（五）不同浓度的多角体对二龄幼虫的敏感性　选择 2 龄幼虫作为观察对象，攻击多角体的浓度分别为 2×10^3 个/立方毫米；2×10^4 个/立方毫米；2×10^5 个/立方毫米及 2×10^6 个/立方毫米均作单次添食感染，方法同前。試驗結果見图 4。

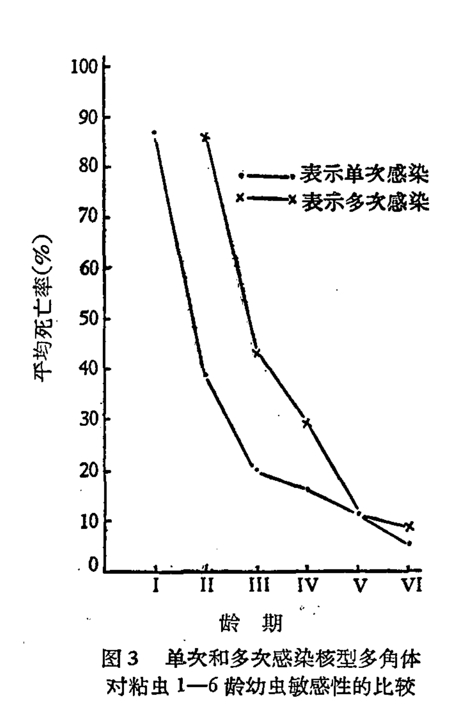


图 3　单次和多次感染核型多角体对粘虫 1—6 龄幼虫敏感性的比较

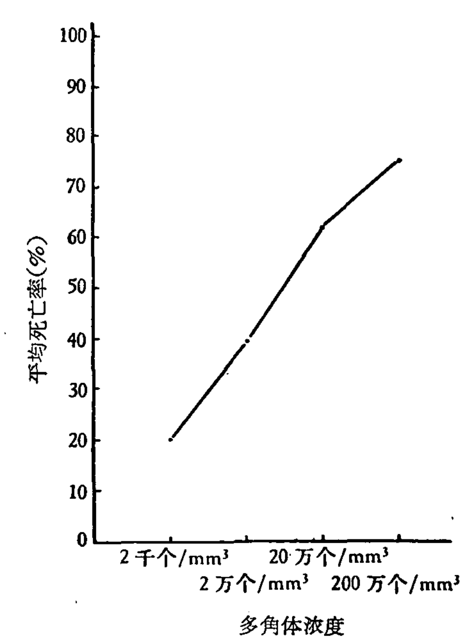


图 4　第二龄粘虫幼虫对不同浓度的核型多角体的敏感性

从图 4 可以看出，以低浓度 2×10^3 个/立方毫米的多角体悬液感染时，平均死亡率仅为 20.0%。2×10^4 个/立方毫米浓度的多角体悬液感染时，平均死亡率为 39.0%。浓度为 2×10^5 个/立方毫米时平均死亡率达 61.7%，悬液浓度为 2×10^6 个/立方毫米时平均死亡率达 75.0%，这些試驗結果表明了，不同浓度的多角体悬液对 2 龄粘虫幼虫的感染作用有明显的差别。在一定范围內，感染性随剂量之增加而提高。

（六）感染后代幼虫对核型多角体的敏感性　我們收集了在感染試驗后未发病致死，还能羽化成蛾的粘虫成虫所产之卵块，所孵出之幼虫称之为感染后代幼虫（第一代）。这些幼虫在飼养过程中有一个显著的特点：发育十分緩慢、食欲不振。因此我們考虑下面的試驗，以考查它們对核型多角体的敏感性。

以第 3 龄感染后代幼虫与健康幼虫用 2×10^4 个/立方毫米的多角体悬液来感染，观察其发病率有无差別。結果感染后代 3 龄幼虫的发病致死率为 34.0%，与正常的 3 龄幼

虫試驗結果相比,死亡率提高約半倍(見表 1)。

表 1 感染后代 III 龄幼虫和正常 III 龄幼虫对核型多角体敏感性比較

分组	感染后代幼虫				正常幼虫試验组				正常幼虫对照组			
	头数	多角体致死(%)	他因致死(%)	化蛹(%)	头数	多角体致死(%)	他因致死(%)	化蛹(%)	头数	多角体致死(%)	他因致死(%)	化蛹(%)
1	20	45	30	25	20	15	50	35	20	5	60	35
2	20	40	45	15	20	15	40	45	20	0	35	65
3	20	15	55	30	20	10	50	40	20	0	50	50
4	20	35	40	25	20	25	10	65	20	0	35	65
5	20	35	25	40	20	35	20	45	15	0	40	60
合计	100	34	41	25	100	20	34	46	95	1	43	56

注: 感染剂量皆为: 以 20,000 个/立方毫米的多角体悬液涂布叶片,喂饲 24 小时。

(七) 核型多角体对温度的稳定性 患核型多角体病而死的幼虫, 誆其尸体自干,置 0℃ 中貯存 230 天,取出,經前述方法制成多角体悬液 2×10^4 个/立方毫米, 以添食方式感染 1 龄幼虫,平均死亡率为 67.5%, 多角体悬液置冰箱 4℃ 87 天, 感染幼虫, 平均死亡率达 80.0%, 这試驗仍在継續进行中。

多角体浓度为 4×10^4 个/立方毫米的悬液分别在 60℃ 和 100℃ 中灭活 10 分鈡, 然后各加入等体积的冷蒸餾水, 使温度迅速下降, 分别感染第 1 龄幼虫。結果发現: 100℃ 作用 10 分鈡后多角体丧失了感染性; 60℃ 处理 10 分鈡者仍可使 1 龄幼虫死亡率达 59.0%。

討 論

从試驗的结果看来,不同龄期粘虫幼虫对核型多角体的感受性有明显差别;其抵抗性与龄期的增长有显著的相关性。即随龄期越大抵抗性也越強, 这种关系不論感染剂量为 2×10^4 个/立方毫米 · 24 小时添食或 2×10^4 个/立方毫米 · 5×24 小时添食 (即連續感染)都表現出同一的趋势。因此,我們認为,如利用核型多角体防除粘虫为害,最好在第 1 龄或第 2 龄幼虫施放多角体。

不同感染剂量对于同一龄期(2 龄)粘虫作用的动态考查方面, 从实驗結果看来,明显地是随着剂量的增加而提高,而持續的使病原体与粘虫接触則結果更佳,如 2×10^4个/立方毫米 · 5×24 小时添食組(即連續五次添食)比单次 2×10^4 个/立方毫米 · 24 小时添食的效果高一倍多。比 2×10^5 个/立方毫米 · 24 小时添食組高出 14.0%。 而多角体的用量则仅为后者的 1/2 和 1/20。 这似乎表明: 病原体浓度达到某一水平时延长病原体与昆虫的接触时間就能得到較理想的經济效果。

感染后代对核型多角体感受性提高的初步結果給我們提供了一个这样的印象: 多角体病毒病原与一般化学杀虫剂会引起昆虫种羣內某些抗葯性种出現的情况相反, 却导致在种羣內提高了感受性。这現象是否与昆虫病毒的潛伏感染有关。感病未死的昆虫可能导致其后代广泛带毒, 因而造成其敏感性提高。也可能由于感染后代幼虫处于一个不正常的生理状态下所致。这問題还有待进一步研究。

多角体对温度是比較稳定的，在4℃或室温下保存多年仍具有感染性(Bergald, 1958)。本报告中提到在0℃保存230天和4℃保存87天的試驗結果并非指多角体的最长保存时間，因为实驗还継續进行，还准备将多角体置室温下和37℃温箱中保存，定期检查其感染活性。多角体对温度比較稳定的这一特性将为利用其防除害虫提供了良好条件。

結　論

本文报告的是一种粘虫核型多角体病，虫尸为灰褐色呈飽脹状外形，皮肤一触卽破。

多角体在核內发育，其大小在1.2—3.6微米之間，染色性与家蚕核型多角体相仿，能被伊紅着色，能溶于0.1N Na_2CO_3中，而不溶于蒸餾水和100℃煮沸。甲醛(36—40%)水溶液、純酒精、二甲苯、乙醚、1N HCl和0.25%胰蛋白酶溶液中。

粘虫对核型多角体的感受性是随着龄期的增长而趋下降。

同一龄期（2龄）的粘虫幼虫受核型多角体感染的发病率是随着剂量的增加而上升。持續感染有很好的效果。

感染后代幼虫对核型多角体的感受性比之正常粘虫幼虫是普遍提高的。

粘虫核型多角体对溫度有一定的抗逆性，冰箱0—4℃貯存3—8个月仍有很高的感染活性。

参　考　文　献

Bergold, G. H. 1958 Handbuch der Virusforschung. 4:60—142. Wien, Springer.
Chapman, J. W. & R. W. Glaser 1915 *J. Econ. Ent.* 8:140—9.
Raun, E. S. 1961 *J. Insect Path.* **3**(2):224—5.
Steinhaus, E. A. 1951 Hilgardia. 20:629—78.
Tanada, Y. 1955 *Proc. Hawaiian ent. Soc.* 15:377.
Tanada, Y. 1956 *J. econ. Ent.* 49:52—7.
Tanada, Y. 1959 *J. Insect Path.* **1**(3):197—214.
Tanada, Y. 1959 *J. Insect Path.* **1**(3):215—31.
Tanada, Y. & G. Y. Chang 1960 *J. Insect Path.* **2**(3):201—8.
Tanada, Y. 1961 *J. Insect Path.* **3**(3):301—23.
Tanada, Y. 1962 *J. Insect Path.* **4**(1):129—31.
Wasser, H. B. 1952 *J. Bacteriol.* 64:787—92.